

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-292427

(43)Date of publication of application : 20.10.2000

(51)Int.Cl.

G01N 33/569

G01N 33/543

(21)Application number : 11-131773

(71)Applicant : INTERNATL REAGENTS CORP

(22)Date of filing : 02.04.1999

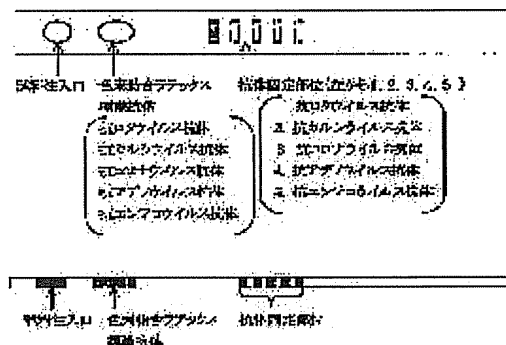
(72)Inventor : HIURA HISAHIDE  
KAMIMURA YATSUHIRO  
ONO NORIYA

## (54) ANTIGEN OR ANTIBODY MEASURING METHOD AND REAGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for measuring a plurality of antigens or antibodies at the same time or in the same apparatus and a measuring reagent.

SOLUTION: About 300  $\mu$ l of a solution of stool is added to a specimen injection port. When an antigen to be detected is present in the added specimen, it reacts with a pigment coupled latex labelled antibody and the resulting composite is captured by the antibody immobilized on a next reaction region to impart the signal of the labelled matter. By this constitution, a plurality of antigens or antibodies can be measured at the same time.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-292427  
(P2000-292427A)

(43) 公開日 平成12年10月20日 (2000. 10. 20)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコト* (参考)
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	G
			A
			B
33/543	5 0 1	33/543	5 0 1 D

審査請求 未請求 請求項の数4 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-131773

(22) 出願日 平成11年4月2日 (1999. 4. 2)

(71) 出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72) 発明者 日裏 久英

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際

試薬株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 上村 八尋

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際

試薬株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 大野 典也

東京都世田谷区深沢2丁目5-15

(54) 【発明の名称】 抗原もしくは抗体の測定法および試薬

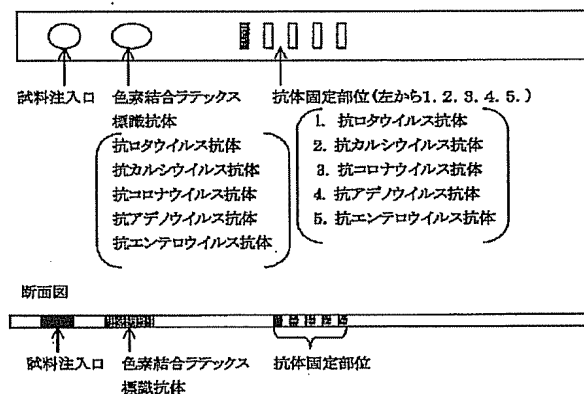
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複数の抗原もしくは抗体を同時もしくは同一装置内で測定する方法及び測定試薬を提供する。

【解決手段】試料注入口に便を溶解した液約300 $\mu$ lを添加する。添加した試料中に検出する抗原が存在すると色素結合ラテックス標識抗体と反応し、更に、その複合体は次の反応部位で固定化されている抗体により捕獲されて標識物のシグナルを与える。

【効果】複数の抗原もしくは抗体を同時に測定することが可能となる。

小児下痢症原因ウイルス検出装置(その1)



**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 2 種以上の抗原もしくは抗体を同時もしくは同一装置内において、免疫化学的に検出又は測定する方法。

【請求項 2】 抗原もしくは抗体がウイルス、リケッチア、細菌および真菌である病原体もしくは病原体に対する抗体を検出又は測定する請求項 1 の方法。

【請求項 3】 2 種以上の抗原もしくは抗体を同時もしくは同一装置内において、免疫化学的に検出又は測定する試薬。

【請求項 4】 抗原もしくは抗体がウイルス、リケッチア、細菌および真菌である病原体もしくは病原体に対する抗体を検出又は測定する請求項 2 の試薬。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は臨床検査診断に用いられる方法および試薬に関する。

**【0002】**

【従来の技術】疾病の起因となっている病原体の検出は、培養法、免疫化学法および遺伝子検査法等が一般的に知られている。病原体を特定することは、治療方針を立てるために必須であるにもかかわらず、病原体が多様多様であるがために簡便に検査することは困難であった。

【0003】例えば、小児下痢症の病原体は、細菌やウイルスにわたって 5 種以上の病原体が知られている。従って、これら病原体を同定するには、5 種以上の各病原体に対する検査を個々に実施しなければならないため、検査時間が長くなり、検査結果が診療に行かされにくいという問題があった。

【0004】よって、迅速且つ簡便に病原体を検出もしくは同定する方法が望まれていた。

【0005】本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、2 種以上の病原体を同時もしくは同一装置内で、免疫化学的手法を用いて、検出又は同定する方法および試薬を発明するに至った。

**【0006】**

【発明が解決しようとする課題】2 種以上の病原体を同時もしくは同一装置内で免疫化学的に検出する方法および試薬により、病原体を迅速且つ簡便に検出もしくは同定して、診断治療に有用な検査方法を提供する。

**【0007】**

【解決する手段】本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、公知の免疫化学手法を用いて、2 種以上の病原体を同時もしくは同一装置内で検出もしくは同定する方法を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0008】本発明の実施態様の例を挙げて本発明を詳細に説明する。公知の免疫化学手法として酵素免疫化学測定法や化学発光化学測定法等の標識物を用いる免疫化学測定法がある。酵素免疫化学測定法を例に取れば、従

来の方法では、マイクロタイタープレート固相の各ウェルに同一組成の抗体もしくは抗原を固定化して、検体と反応させ抗原抗体反応により固相に分析対象物を捕獲する。次いで、標識抗体もしくは抗原を反応させた後、分析対象物の量に対応する信号を発生させ、その信号を検出することにより分析対象物の存否や濃度等を求める。

【0009】本発明の方法では、上記のマイクロタイタープレートを用いる場合、全ウェルに同一組成の抗体もしくは抗原を固相化するのではなく、目的とする病原体の数に応じた抗体もしくは抗原の 2 種以上をそれぞれのウェルに固相化する。例えば 5 種類の抗原もしくは抗体を固相化する場合には、ウェル No. 1 から 5 にそれぞれ抗原もしくは抗体 No. 1 から 5 を対応させて固相化させる。このウェル No. 1 から 5 を 1 セットにして使用する。

【0010】同一検体を上記ウェル No. 1 から 5 に反応させた後、それぞれの標識抗原もしくは抗体を反応させ、各ウェルの信号を測定して病原体の検出もしくは同定を行う。以上のように、各々の抗原もしくは抗体に対する標識抗原もしくは抗体を用いても良いが、分析対象物の組み合わせによっては分析対象物の共通抗原もしくは共通抗原を認識する抗体を用いることもできる。本発明により、同時又は同一装置で複数の病原体を検出または測定することが可能になる。

【0011】上記の例では各ウェルに各抗原もしくは抗体を固相化させたセットを調製したが、本発明は更に、一つのウェルに複数の抗原もしくは抗体を固相化させておくことも含まれる。例えば 2 種類の抗原もしくは抗体を一つのウェルに固相化させ、検体を反応させた後、各標識抗原もしくは抗体を反応させ、信号を計測する。この場合、標識物質をそれぞれ異なった標識物質を用いることにより、それぞれの信号を識別できる。このような標識物質の組み合わせとして、異なった酵素の組み合わせ、例えばペルオキシダーゼとアルカリホスファターゼおよび  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの組み合わせ、異なった発光物質の組み合わせ、例えばアクリジニウムエステルとエクオリンの組み合わせ、更に、酵素、発光物質および蛍光物質の組み合わせも利用でき、異なった信号を生じる組み合わせであれば特に限定されない。

【0012】上述の例は、マイクロタイタープレートを用いた例であるが、本発明は更に、固相の形態を特に限定するものではない。抗原もしくは抗体を固定化できるものであれば利用できる。例えば、ガラスフィルター、濾紙およびメンブランフィルター等も用いる事ができる。このような多孔性の固相を用いる場合には、検体や標識抗原もしくは抗体を膜表面に対して垂直方向および平行方向の何れかの方向に移動させる方法も適用できる。すなわち、膜表面に垂直な方向に移動させる方法の例として、複数個の反応部位を持つ一連のデバイスの各反応部位にそれぞれ検体を反応させ、標識抗原もしくは

抗体を反応させた後信号を検出する方法がある。

【0013】一方、平行に移動させる例として、複数の反応装置を一連に組み込んだ装置や一つの反応装置内に複数の反応部位を直線状にならべた装置が可能である。これらの装置は一般にイムノクロマト法といわれるものを応用できる。ここで用いられる標識物は、前述の酵素、発光および蛍光物質の他、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子や蛍光粒子等の粒子状物質に抗原もしくは抗体を標識することもできる。

【0014】本発明の方法において、検出又は測定される抗原もしくは抗体は免疫学的に反応する物質であれば特に限定されないが、例えば、小児下痢症診断のための病原体、ロタウイルス、カルシウイルス、コロナウイルス、アデノウイルスおよびエンテロウイルスを検出、同定するためのセットが有用である。また上気道感染症の診断にはインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルスやマイコプラズマニューモニエ等の細菌の検出、同定のセットが有用である。さらに、インフルエンザウイルスの型別診断（ホンコンA、B他）のセットや肝炎ウイルスの型別診断（A、BおよびC等）セット、HIV、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスの抗原又は抗体の検査セット等も可能である。

【0015】本発明はウイルスだけではなく細菌およびその代謝産物の検出同定にも適用される。血液中に細菌が感染して引き起こされる敗血症は重篤な病態をしめし、その起炎菌を迅速に検出同定することは、診断治療に有用である。そのために、スタフィロコッカス Aureus、ストレプトコッカス ニューモニエおよびストレプトコッカス ピオゲネス等のセットが可能である。

【0016】その他、病原性大腸菌の型別診断のセット等、同時に複数種の病原体の検出、同定には取り分け本発明は有用である。

【0017】上述のごとく複数種の病原体の検出同定のみならず、例えば癌胎児性抗原類のセットによる癌の診断や甲状腺ホルモン関連項目セットによる内分泌検査等も本発明により可能である。

【0018】

【実施例】本発明を更に説明するため実施例を挙げて説明するが、本発明はこの実施例に何ら限定されるものではない。

【0019】

【実施例1】市販のマイクロタイタープレート（8ウエル×12）に抗ロタウイルス抗体、抗カルシウイルス抗体、抗コロナウイルス抗体、抗アデノウイルス抗体および抗エンテロウイルス抗体をそれぞれ20μg/mlとなるように20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH=7.2）で調製した。Aウエルには抗ロタウイルス抗体、Bウエルには抗カルシウイルス抗体、Cウエルには抗コロナウイルス抗体、Dウエルには抗アデノウイルス

抗体およびEウエルには抗エンテロウイルス抗体をそれぞれ100μlずつを分注した。分注後2~8℃で一夜放置後、各抗体液を除去し、0.1%BSAを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH=7.2）で洗浄後、同緩衝液300μlずつを分注し、2~8℃で一夜放置した。調製した抗体固定プレートを用いて測定を行った。

【0020】

【実施例2】実施例1で調製した抗体固定プレートの緩衝液を除いた後、あらかじめ1%BSAおよび0.15M NaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH=7.2）10mlに小児下痢症の患者の糞便1gを溶解した試料100μlずつをAウエルからEウエルに分注し、室温で45分間反応させた。反応終了後、反応液を吸引除去し、洗浄液で洗浄後、Aウエルにはペルオキシダーゼ標識抗ロタウイルス抗体、Bウエルにはペルオキシダーゼ標識抗カルシウイルス抗体、Cウエルにはペルオキシダーゼ標識抗コロナウイルス抗体、Dウエルにはペルオキシダーゼ標識抗アデノウイルス抗体およびEウエルにはペルオキシダーゼ標識抗エンテロウイルス抗体をそれぞれ100μlずつを分注した。室温で45分反応後、反応液を吸引除去し、洗浄液で洗浄後、オルソフェニレンジアミン-過酸化水素基質液100μlずつを分注し、室温で45分反応後、2N-硫酸を100μlずつを分注して反応を終了させ、各ウエルの492nmでの吸光度を測定した。その結果を表1に示す。

【0021】

【表1】

小児下痢症糞便中のウイルス検出結果

ウエル	検体の吸光度 (492 nm)	ブランクの吸光度 (492 nm)
A	0.528	0.042
B	0.065	0.061
C	0.057	0.055
D	0.055	0.048
E	0.069	0.059

【0022】以上の結果Aウエルの吸光度がブランクの吸光度より有意に高く、本下痢症の糞便中にはAウエルと反応する病原体、ロタウイルスが存在することがわかった。このように本発明では短時間に同時に複数種の検出同定が可能であった。

【0023】

【実施例3】免疫反応用チューブに抗B型肝炎ウイルス表面抗原抗体（抗HBs抗体）および抗B型肝炎ウイルスe抗原抗体（抗HBe抗体）を10μg/mlで300μlずつ分注して一夜2~8℃で放置した。抗体液を

除去し、0.1%BSAを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH=7.2)で洗浄後、同緩衝液500μlずつを分注し、2~8℃で一夜放置した。調製した抗体固定チューブを用いて測定を行った。

#### 【0024】

【実施例4】実施例3で調製した抗体固定チューブの緩衝液を除いた後、1%BSAおよび0.15M NaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH=7.2)300μlに患者の血清20μlを分注し、室温で攪拌しながら9分間反応させた。反応終了後、反応液を

10 吸引除去し、洗浄液で洗浄後、あらかじめ調製しておい

#### 【表2】

肝炎患者の血清中のHBs抗原およびHBe抗原の検出

血 清	アクリジニウムエステル 発光強度 (カウント/秒)	エクオリン発光強度 (カウント/秒)
A	15325	12689
B	256	326
C	22324	269
陽性コントロール	18503	15698
ブランク	235	257

【0026】以上の結果、血清AはHBs抗原とHBe抗原の両方が陽性で、血清Bは共に陰性、血清CはHBs抗原のみが陽性であることが判った。

#### 【0027】

【実施例5】小児下痢症診断のための装置として図1に示したデバイスを調製した。試料注入孔に便を溶解した液を約300μlを添加する。添加した試料中に検出する抗原が存在すると色素結合ラテックス標識抗体と反応して更に、その複合体は次の反応部位で固定化されている抗体により捕獲され標識物がシグナルを与える。実施例2で測定した試料を本装置で測定すると、ロタウイルスの箇所

#### 【0028】

【実施例6】小児下痢症診断のための装置として図2に示したデバイスを調製した。試料注入孔に便を溶解した液を約300μlを添加する。添加した試料中に検出

たアクリジニウムエステル標識抗HBs抗体とエクオリン標識抗HBe抗体の混合組成液300μlを分注した。室温で9分反応後、反応液を吸引除去し、洗浄液で洗浄後、先ずエクオリンの発光開始剤である0.1M塩化カルシウム液を300μl分注し、発光検出器で発光強度を測定した。次いで反応液を除去し、アクリジニウムエステルの発光開始剤である0.1N水酸化ナトリウム液300μlを分注して、発光検出器で発光強度を測定した。その結果を表2に示す。

#### 【0025】

る抗原が存在すると色素結合ラテックス標識抗体と反応して更に、その複合体は次の反応部位で固定化されている抗体により捕獲され標識物がシグナルを与える。実施例2で測定した試料を本装置で測定すると、ロタウイルスの箇所

#### 【0029】

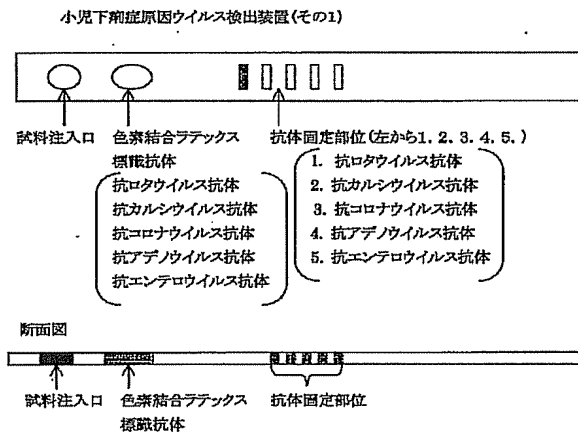
【発明の効果】従来は分析対象物の種類の数に応じた分析回数が必要であったが、本発明により、複数の抗原もしくは抗体を同時もしくは同一装置内で測定することが可能で、分析対象物の種類の数に関係なく一度で分析が可能となった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】小児下痢症原因ウイルス検出装置である。

【図2】別形態の小児下痢症原因ウイルス検出装置である。

【図 1】



【図 2】

